

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 12 月 18 日 (18.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/104446 A1(51) 国際特許分類:
15/57, 1/21, 1/20, 11/00, C12P 37/04

C12N 9/80,

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西 聡子
(NISHI, Akiko) [JP/JP]; 〒674-0069 兵庫県 明石市 大
久保町わかば 7-5 D 2 0 2 Hyogo (JP). 真野 拓
巳 (MANO, Takumi) [JP/JP]; 〒679-4108 兵庫県 龍野
市 神岡町大住寺 7 5 0-7 Hyogo (JP). 横田 真一
(YOKOTA, Shinichi) [JP/JP]; 〒675-0045 兵庫県 加古
川市 西神吉町岸 6 8 4-9 Hyogo (JP). 高野 昌行
(TAKANO, Masayuki) [JP/JP]; 〒675-0036 兵庫県 加古
川市 加古川町西河原 3 4-8 0 9 Hyogo (JP). 矢島
麗嘉 (YAJIMA, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒673-0005 兵庫県
明石市 小久保 1 2 0-5 5-A 8 0 4 Hyogo (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP03/06807

(22) 国際出願日:

2003 年 5 月 30 日 (30.05.2003)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-165722 2002 年 6 月 6 日 (06.06.2002) JP

(74) 代理人: 安富 康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒
532-0011 大阪府 大阪市 淀川区 西中島 5 丁目 4 番
2 0 号 中央ビル Osaka (JP).(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化
学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP];
〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島 3 丁目 2 番 4 号
Osaka (JP).(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

[続葉有]

(54) Title: NOVEL ACYLASE GENE

(54) 発明の名称: 新規アシラーゼ遺伝子

(57) Abstract: It is intended to provide a highly active β -lactam acylase protein; a gene encoding this β -lactam acylase protein; a recombinant vector having this gene; a transformant containing this recombinant vector; and a process for producing a β -lactam antibiotic such as amoxicillin with the use of the β -lactam acylase. A *Stenotrophomonas* β -lactam acylase gene is obtained by cloning a β -lactam acylase gene of *Stenotrophomonas maltophilia* and determining its DNA base sequence and an amino acid sequence anticipated therefrom.

(57) 要約:

本発明の課題は、活性の高い β -ラクタムアシラーゼタンパク質、当該 β -ラクタムアシラーゼタンパク質をコードする遺伝子、当該遺伝子を有する組換えベクター、当該組換えベクターを含む形質転換体、および当該 β -ラクタムアシラーゼを用いたアモキシシリン等の β -ラクタム系抗生物質製造方法を提供することである。ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) の β -ラクタムアシラーゼ遺伝子をクローニングして DNA 塩基配列及びそれから予想されるアミノ酸配列を決定し、ステノトロフォモナス β -ラクタムアシラーゼ遺伝子を取得した。



DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

新規アシラーゼ遺伝子

技術分野

- 5 本発明はステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属 β -ラクタムアシラーゼをコードするDNAを有する遺伝子及び基質分解を低減させアシラーゼ活性を増強させた該改変遺伝子、当該遺伝子の塩基配列から予想されるタンパク質、当該遺伝子によりコードされた β -ラクタムアシラーゼ、当該遺伝子を有する組換えベクター、当該組換えベクターを含む形質転換体、当該酵素
- 10 の製造方法および当該酵素を用いた β -ラクタム系抗生物質の生産方法に関する。

背景技術

- アモキシシリン、アンピシリン、セファロスポリンをはじめとする多くの β -ラクタム系抗生物質は、ペニシリウム (*Penicillium*) 属およびセファロスポリウム (*Cephalosporium*) 属等の菌類を培養することによって得られる発酵生成物を出発材料として製造されている。
- 15

- たとえば、ペニシリンG (*PenG*)、ペニシリンV (*PenV*) あるいはセファロスポリンCからアミド結合を開裂(脱アシル化)し、半合成ペニシリン及びセファロスポリンの工業的生産の最も重要な中間体である6-アミノペニシラン酸(6-APA)あるいは7-アミノセファロスポラン酸(7-ACA)を生産するために、ペニシリンGアシラーゼ(ペニシリンGアミダーゼとも称されるベンジルペニシリンアミドヒドロラーゼ、EC 3. 5. 1. 11)が産業上使用されている。この酵素は、*PenG*から通常化学的に製造されるフェニルアセチル-7-アミノデアセトキシセファロスポラン酸の、7-アミノデアセトキシセ
- 20
- 25 ファロスポラン酸(7-ADCA)への変換にも工業的に使用されている。これら β -ラクタム母核である6-APA、7-ACA、7-ADCAと側鎖化合物との化学合成反応により製造された半合成ペニシリン類およびセファロスポリン類は、 β -ラクタム系抗生物質の重要な市場を形成している。

従来 β -ラクタム母核生産での脱アシル化において有用な酵素は、加水分解酵

素として分類され、当該分野においては通常「アシラーゼ」もしくは「アミダーゼ」と呼ばれている。これらアシラーゼ酵素の中でも β -ラクタム系抗生物質を基質として認識するものは、さらに「 β -ラクタムアシラーゼ」として特定されている。この β -ラクタムアシラーゼの活性には、アシル基が水によって脱離する場合の加水分解（脱アシル）活性と、その可逆反応である活性化された側鎖基質から求核物質へのアシル基の転移を触媒する転移活性がある。この化学的形態は次の一般式によって表される。すなわち、特定のアシラーゼによって基質として受け入れられる化合物： $X-CO-NH-Y$ における該化学的形態XおよびYの特性は、該当するアシラーゼの基質特異性によって決定される。Xは側鎖を表し、一方Yはアシルアクセプタ基を表している。例えば、PenGの場合X-CO-はフェニルアセチル側鎖を表し、かつ-NH-Yは6-APAを表している。これら β -ラクタムアシラーゼは、 β -ラクタム系抗生物質の生産において、アシル基転移反応工程を化学合成法から酵素法へ転換する可能性があることにより注目されているが、いまだ生産効率が悪い点から実用化には至っていない。

β -ラクタムアシラーゼは、基質特異性や分子的特徴において以下のように分類されている（Process Biochemistry, 27, 131, 1992、World J. Microbiology & Biotechnology, 10, 129, 1994）。 β -ラクタムアシラーゼは大きく分けて、ペニシリンアシラーゼとセファロスポリンアシラーゼに分類され、さらにペニシリンアシラーゼはペニシリンGアシラーゼと、ペニシリンVアシラーゼ、アンピシリンアシラーゼに細分類され、セファロスポリンアシラーゼは、セファロスポリンアシラーゼとグルタリル-7-ACA（GL-7-ACA）アシラーゼに細分類される。

これまで6-APA生産等で産業上利用されてきたペニシリンGアシラーゼは小サブユニット（ α ：16-26 kDa）と大サブユニット（ α ：54-66 kDa）からなるヘテロ2量体を形成しており、一方ペニシリンVアシラーゼは分子量35 kDaのサブユニットの4量体、また、アンピシリンアシラーゼは分子量72 kDaのホモ2量体の形成が知られている。また、基質特異性より、 α アミノ酸ヒドロラーゼという名前をもつものもあるが、この場合も化学反応の形態

では上記アシラーゼ活性に含まれる。

これらアシラーゼのうちペニシリンGアシラーゼをコードしている微生物のアシラーゼ遺伝子配列が明らかにされている。即ち、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) (Nucleic Acids Res., 14 (14), 5713, 1996)、クルイベラ シトロフィリア (*Kluyvera citrophila*) (Gene, 49, 69, 1986)、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*) (特開平4-228073)、プロビデンシア レテグリ (*Providencia rettgeri*) (DNA seq., 3, 195, 1992)、アリスロバクター ビスコサス (*Arthrobacter viscosus*) (Appl. Environ. Microbiol., 54, 2603, 1988)、アーケオグロバス フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*) (Nature, 390, 364, 1997)、バチルス メガテリウム (*Bacillus megaterium*) (FEMS Microbiol. Lett. 125, 287, 1995) 等である。また、ヘテロ2量体構造を持つ、GL-7-ACAアシラーゼはシュードモナス (*Pseudomonas*) sp. (J. Ferment. Bioeng., 77, 591, 1994)、セファロスポリンアシラーゼはシュードモナス (*Pseudomonas*) sp. (J. Bacteriol., 163, 1222, 1985、J. Bacteriol., 169, 5821, 1987) 等が明らかにされている。

これらは遺伝子ファミリーとしてDNAレベルで明らかにされているため遺伝子クローニングは容易であり、また、微生物ゲノムライブラリーの酵素活性を指標にした方法によってスクリーニングすることによるDNA取得も容易に可能である。

25

発明の要約

本発明が解決しようとする課題は、活性の高い β -ラクタムアシラーゼタンパク質、当該 β -ラクタムアシラーゼタンパク質をコードする遺伝子、当該遺伝子を有する組換えベクター、当該組換えベクターを含む形質転換体、および当該 β

ーラクタムアシラーゼを用いたアモキシシリン等のβーラクタム系抗生物質の製造方法を提供することである。従来のペニシリンGアシラーゼはアモキシシリン等のβーラクタム系抗生物質への合成効率が低く、またフェニル酢酸、フェノキシ酢酸やアモキシシリンで合成活性が強く阻害されるため、これら性質が改善された酵素の出現が工業的に有利であるために求められていた。

我々は6ーアミノペニシラン酸（6-APA）とD-pーハイドロキシフェニルグリシンメチルエステル（HPGOMe）からアモキシシリンを効率よく生産する酵素を得ることを目的として様々な菌株を土壌よりスクリーニングした結果、グラム陰性細菌であるステノトロフォモナス（*Stenotrophomonas*）属に属する微生物がβーラクタムアシラーゼを生産することを見出した。この菌株からβーラクタムアシラーゼを精製し、さらにその遺伝子クローニングを行った。その結果、βーラクタムアシラーゼ遺伝子をクローニングして配列番号1で示されるDNA塩基配列を決定した。本発明でいう遺伝子とは、機能を持つ核酸上の配列であり、例えばタンパク質やtRNA、rRNAなどの一次構造を規定している核酸上の領域、またはmRNAへの転写調節領域、タンパク質への翻訳調節領域などの制御機能を持つ核酸上の領域を含む。該遺伝子のオープンリーディングフレームは1911塩基からなり、配列番号2で示される636アミノ酸配列からなる分子量約70kDaのタンパク質をコードしていることが判明した。さらに、該遺伝子を宿主中で発現させ、アシル化活性を有することを確認した。また、該構造遺伝子中、配列番号1で示されるDNA塩基配列の735番目のアデニンをグアニンに置換して、配列番号2で示されるアミノ酸配列の204番目のメチオニンをバリンに変異させることにより、基質D-pーハイドロキシフェニルグリシンメチルエステル（HPGOMe）のエステル分解活性が低減しアシラーゼ活性が増強した改変アシラーゼを創製することに成功し、本発明を完成するに至った。

本発明のβーラクタムアシラーゼ生産菌はステノトロフォモナス（*Stenotrophomonas*）属に属し、本発明者らが土壌より分離したステノトロフォモナス マルトフィリア（*Stenotrophomonas maltophilia*）KNK12A株は本発明に最も有効に使用される菌株の一例であ

る。

即ち、本発明は、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物が産生する β -ラクタムアシラーゼ、およびステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12A株が産生する β -ラクタムアシラーゼ、及び該酵素の基質D-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル (HPGOMe) のエステル分解活性を低減させることによりアシラーゼ活性を増強させた改変アシラーゼに関する。

さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子に関し、また、配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンがバリンであるタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子に関し、さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンが置換されたタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子に関し、また、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子に関し、さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子に関する。

さらに、本発明は、配列番号1で示される塩基配列において、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNAを含む遺伝子に関する。また、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物から単離された上記遺伝子に関する。

また、本発明は、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質を生産し、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物に関する。

また、本発明は、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチ

ド、および配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 204 番目のメチオニンがバリンであるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 204 番目のメチオニンが置換されたタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号 5 2 で示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号 10 1 で示される塩基配列において、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号 1 で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、および、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物から単離された上記ポリヌクレオチドに関する。 15

さらに、本発明は、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質に関し、また、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 204 番目のメチオニンがバリンであるアミノ酸配列からなるタンパク質に関し、また、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 204 番 20 目のメチオニンが置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質に関し、また、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質に関する。

さらに、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ 25 β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質に関する。

また、本発明は、上記遺伝子に含まれる転写調節配列を含む遺伝子；上記遺伝子に含まれる翻訳調節配列を含む遺伝子；転写及び／又は翻訳調節配列を含むレギュロンの制御下にある上記遺伝子であって、当該調節配列の一方または両方がそれぞれ同じ又は異なる生物から得られた他の転写及び／又は翻訳調節配列に置

き換えられている遺伝子に関する。

さらに、本発明は、上記遺伝子を1以上含む組換えベクター、上記組換えベクターで宿主を形質転換してなる形質転換体、宿主がグラム陰性微生物である上記形質転換体、宿主がグラム陽性微生物である上記形質転換体、pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101 (FERM BP-8362) である上記形質転換体、及びpUCNT-Tn5-MuKNK-L1/HB101 (FERM BP-8369) である上記形質転換体に関する。

また、本発明は、上記形質転換体を培養し、当該形質転換体が産生した β -ラクタムアシラーゼを回収することからなる β -ラクタムアシラーゼの製造法に関する、上記ポリヌクレオチドによりコードされたアミノ酸配列からなる β -ラクタムアシラーゼにも関し、さらに、上記微生物または上記形質転換体を培養し、その菌体、菌体混合培養液、菌体の破砕物、もしくは、菌体から抽出精製された β -ラクタムアシラーゼ、を固定化してなる固定化 β -ラクタムアシラーゼに関する。

さらに、上記組換えベクターを調製し、当該ベクターで宿主を形質転換し、得られた形質転換体をクローン化し選択することからなる、形質転換体中で β -ラクタムアシラーゼを産生するまたはその産生を増強する方法に関する。

また、本発明は、当該酵素を用いた、アモキシシリン等の β -ラクタム系抗生物質の製造方法に関する。

また、上記ポリヌクレオチドによりコードされたアミノ酸配列からなる β -ラクタムアシラーゼにより、アモキシシリン等の β -ラクタム系抗生物質を製造する方法に関する。

本発明のステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属 β -ラクタムアシラーゼ酵素は、報告されているエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) ペニシリンGアシラーゼ (*Nucleic Acids Res.*, 14 (14), 5713, 1996)、クルイベラ シトロフィリア (*Kluyvera citrophila*) ペニシリンGアシラーゼ (*Gene*, 49, 69, 1986)、アルカリゲネス フェカリス (*Alcaligenes faecalis*) ペニシリンGアシラーゼ (特開平4-22807

3)、プロビデンシア レテグリ (*Providencia rettgeri*) ペニシリンGアシラーゼ (DNA seq., 3, 195, 1992)、アリスロバクター ビスコサス (*Arthrobacter viscosus*) ペニシリンGアシラーゼ (Appl. Environ. Microbiol., 54, 2603, 1988)、アーケオグロバス フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*) ペニシリンAアシラーゼ (Nature, 390, 364, 1997)、バチルス メガテリウム (*Bacillus megaterium*) ペニシリンGアシラーゼ (FEMS Microbiol. Lett., 125, 287, 1995)、シュードモナス (*Pseudomonas*) C427 GL-7ACAアシラーゼ (J. Ferment. Bioeng., 77, 591, 1994)、シュードモナス (*Pseudomonas*) GK16 セファロスポリンアシラーゼ (J. Bacteriol., 163, 1222, 1985)、シュードモナス (*Pseudomonas*) SE83 セファロスポリンアシラーゼ (J. Bacteriol., 169, 5821, 1987) の遺伝子配列と特徴的な相同性を示さない。また、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属 β -ラクタムアシラーゼに関するDNA配列ならびにアミノ酸配列に関する報告はない。

酵素遺伝子を取得する過程で、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12A株ゲノムライブラリーから通常のアシラーゼ酵素活性測定スクリーニングも試みたが、活性を示す陽性クローンを得ることはできなかった。これは、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) β -ラクタムアシラーゼ自身のプロモーターが宿主大腸菌内でRNA転写活性を持たないあるいは弱いので、宿主大腸菌内で酵素が発現しない又は発現が非常に弱いと推測された。

図面の簡単な説明

図1は、実施例5で行った本発明の1態様である β -ラクタムアシラーゼ遺伝子の発現ベクターの構築図である。

図 2 は、実施例 1 2 で構築した本発明の変異 β -ラクタムアシラーゼ遺伝子の発現ベクター図である。

図 3 は、試験例 1 で行ったアモキシシリンの合成活性の比較結果を示すグラフである。

5 図 4 は、試験例 3 で行ったアモキシシリンの分解活性の比較結果を示すグラフである。

図 5 は、試験例 1 で行った D-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル (HPGOMe) の分解活性の比較結果を示すグラフである。

10 図 6 は、実施例 1 3 で行った変異 β -ラクタムアシラーゼのアモキシシリンの合成活性の比較結果を示すグラフである。

図 7 は、実施例 1 3 で行った D-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル (HPGOMe) のエステル分解活性の比較結果を示すグラフである。

15 なお、図 3、図 4、図 5、図 6 および図 7 のグラフ中において、KNK 1 2 A はステノトロフォモナス マルトフィリア KNK 1 2 A 株由来 β -ラクタムアシラーゼを表し、PenG amidase はエシェリヒア コリ由来 PenG amidase を表し、変異型は pUCNT-Tn 5-MuKNK-L 1/H B 1 0 1 株産生 1 アミノ酸置換変異 β -ラクタムアシラーゼを表す。

発明の詳細な開示

20 以下、本発明を詳細に説明する。

ここで述べる遺伝子とは、アミノ酸をコードする領域と、5' 上流および 3' 下流で RNA に転写される領域、さらにこの領域外の部分でも転写および翻訳の実行や効率に関わる調節領域を含む領域のことを示す。ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) 由来の本発明の遺伝子をステノトロフォモナス マルトフィリア- β -ラクタムアシラーゼ (smacy)、smacy 遺伝子の発現ポリペプチドを SMACY と略する。

本発明の一つの形態によると、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物が産生する β -ラクタムアシラーゼが提供され

る。ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物としては、 β -ラクタムアシラーゼを産生する能力がある限り特に限定されないが、例えば、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*)、ステノトロフォモナス アシダミニフィラ (*Stenotrophomonas acidaminiphila*)、ステノトロフォモナス アフリカナ (*Stenotrophomonas africana*)、ステノトロフォモナス ニトリトイレダカアンス (*Stenotrophomonas nitritireducans*) 等が挙げられる。

- 10 好ましくはステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12A株が産生する β -ラクタムアシラーゼが提供される。

- さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質もしくは、配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質もしくは、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質が提供される。

- さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質もしくは、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを有する遺伝子が提供される。本発明のDNAであって配列番号1と完全同一の塩基配列を有しないものを、以下では「DNA変異体」とも称する。

- 25 当該遺伝子は、好ましくはステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物から単離されたものである。より好ましくはステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) から単離されたものである。

ここで、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、活性が性質的に同質なタンパ

ク質を構成しており、配列番号2で示される全アミノ酸配列との相同性の程度が全体で約80%以上、好ましくは約90%以上であるアミノ酸配列を意味する。

また、「1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加」とは、部位特異的突然変異誘発法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されることを意味する。

つまり、本発明において、DNA変異体は、当該分野において既知の方法によって、配列番号1の塩基配列からなるDNAから調製することができる。このような操作としては、例えば、部位特異的突然変異誘発、点変異、欠失、重複、逆位、転座、遺伝コードの縮重等により、アミノ酸配列を変えずに塩基配列のみを変更する保存的変異が挙げられる。

上記DNA変異体としては、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンが置換されたタンパク質をコードするDNAが好ましく、なかでも、配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンがバリンであるタンパク質をコードするDNAがより好ましい。配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンをバリンに置換するには、例えば、配列番号1で示されるDNA塩基配列の735番目のアデニンがグアニンに置換されたDNAを用いる。

さらに、配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつβ-ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを有する遺伝子が提供される。

ここで、「翻訳後修飾」とは、mRNAからタンパク質へ翻訳後の部分的なアミノ酸配列の除去や修飾であり、たとえば、微生物のペリプラズム領域へタンパク質が移行する際に必要であるシグナル配列（タンパク質N末端部分の約20アミノ酸であり疎水性アミノ酸を特徴とする）が酵素的に除去されたものである。

β-ラクタムアシラーゼ活性とは、アシル基が水によって脱離する場合には加水分解（脱アシル）活性をさし、可逆反応として活性化された側鎖基質から求核物質へのアシル基の転移を触媒する場合には転移活性をさす。なお、加水分解活性の場合は、1ユニットは1分間あたり1 μmole のアモキシシリンの加水分解を触媒する酵素量とし、また、転移活性の場合は、1ユニットは1分間あたり

1 μmol のアモキシシリンを合成する酵素量とし、HPLC等を用いて定量を行うことができる。

さらに、本発明の遺伝子は、配列番号1で示される塩基配列において、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNAを含む遺伝子であってよい。つまり、配列番号1で示される塩基配列は、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNAを含有するものである。

また、本発明は、以下のポリヌクレオチドを提供するものである。配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンがバリンであるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンが置換されたタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、および配列番号1で示される塩基配列において、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド、配列番号1で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド、および、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物から単離された上記ポリヌクレオチド。

さらに、本発明のタンパク質としては、配列番号2のアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質であってよいし、また、配列番号2のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質であってよいし、また、配列番号2で示されるアミノ酸配列において、

翻訳後修飾され、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質であつてもよい。本発明のタンパク質であつて配列番号2と完全同一のアミノ酸配列を有しないものを、以下では「変異タンパク質」とも称する。

この際、変異タンパク質としては、上述のようなDNA変異体によってコードされるタンパク質、さらには、基本的な β -ラクタムアシラーゼ活性は変化させずにアミノ酸配列が保存的あるいは半保存的に変更（例えば、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン等の脂肪族鎖を有するアミノ酸同士の置換や、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン等の芳香族鎖を有するアミノ酸同士の置換）されたタンパク質等が挙げられる。

- 10 上記変異タンパク質として、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンが置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質が好ましく、なかでも、配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンがバリンであるアミノ酸配列からなるタンパク質がより好ましい。このような変異 β -ラクタムアシラーゼは、基質D-p-ヒドロキシフェニルグリ
15 シンメチルエステル（HPGOMe）のエステル分解活性が低減されアシラーゼ活性が増強される。

- また、本発明は、上述の本発明の遺伝子に含まれる転写調節配列を含む遺伝子、及び、翻訳調節配列を含む遺伝子を提供する。当該転写調節配列としては、配列番号1の125番目から100塩基上流部分を含む配列である。当該翻訳調節配
20 列としては、配列番号1の125番目から50塩基上流部分を含む配列である。

さらに、本発明は、転写及び／又は翻訳調節配列を含むレギュロンの制御下にあり、当該調節配列の一方または両方が、それぞれ同じ又は異なる生物から得られた他の転写及び／又は翻訳調節配列に置き換えられている遺伝子を提供する。

- ここで、同じ又は異なる生物から得られた他の転写調節配列及び翻訳調節配列
25 としては、本発明の遺伝子を発現できるものであれば特に制限されることはなく、当該分野において既知のものが使用される。具体的には、大腸菌や放線菌由来の一般的な調節配列等が挙げられる。

本発明の別の形態によると、上述の本発明の遺伝子を1以上含む組換えベクターが提供される。また、当該組換えベクターを含む形質転換体も提供される。

この組換えベクターは、本発明の遺伝子を、適当な制限酵素で切断された組換え用ベクター中に連結されることによって調製される。

本発明の組換えベクター作製に用いられる組換え用ベクターとしては、従来公知のものを使用することができ、例えば、転写効率を上げるために例えば *lac* オペロン、T7 RNAポリメラーゼプロモーターなどを挿入遺伝子上流に付与し、選択マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子などを持つベクター等が挙げられる。

組換えベクターの調製法としては、当業者に周知の方法を採用することができ、例えば、Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 等に記載の方法を適用することができる。

また、形質転換体の作製に用いられる宿主としては、特に制限されないが、例えば、グラム陰性微生物、グラム陽性微生物等が挙げられる。グラム陰性微生物としては、例えば、エシェリヒア (*Escherichia*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属等が挙げられ、グラム陽性微生物としては、例えば、バチルス (*Bacillus*) 属、ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属が挙げられる。

形質転換体の調製法としては、当業者に周知の方法を採用することができ、例えば、Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 等に記載の方法を適用することができる。

このようにして得られた形質転換体としては、具体的には pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101 (受託番号; FERM BP-8362、寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)、原寄託日; 平成14年10月30日)、及び pUCNT-Tn5-MuKNK-L/HB101 (受託番号; FERM BP-8369、寄託機関; 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)、原寄託日; 平成15年4月23日) を挙げるができる。

さらに本発明は、上述した制御配列に関して操作された、 β -ラクタムアシラーゼ遺伝子を含む組換えベクター、および当該組換えベクターを含む形質転換体を提供する。

本発明の別の形態によると、上記形質転換体を培養し、当該形質転換体が産生した β -ラクタムアシラーゼを回収することからなる β -ラクタムアシラーゼの製造法、つまり、 β -ラクタムアシラーゼをコードされた形質転換体、または β -ラクタムアシラーゼをコードされた組換えベクターを含む形質転換体を培養し、単離形態の β -ラクタムアシラーゼを回収することからなる β -ラクタムアシラーゼの製造方法を提供する。

また、上記微生物または上記形質転換体を培養し、その菌体、菌体混合培養液、菌体の破砕物、もしくは、菌体から抽出精製された β -ラクタムアシラーゼ、を固定化してなる固定化 β -ラクタムアシラーゼを提供する。

さらに、上記組換えベクターを調製し、当該組換えベクターで宿主を形質転換し、得られた形質転換体をクローン化し選択することからなる、形質転換体中で β -ラクタムアシラーゼを産生する又はその産生を増強する方法を提供する。

形質転換体は通常の栄養培地で培養することにより導入した組換えDNAの形質を発現させることができる。組換えDNAに遺伝子DNAまたはベクターDNA由来の性質が付与されている場合は、その性質に合わせて培地に薬剤（例えばカナマイシン、ネオマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン等）を補ってもかまわない。

このようにして得られた形質転換体を酵素源として得るには、通常の培地を用いて培養を行えばよいが、必要に応じてIPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) 等の添加などの酵素誘導のための処理を行うこともできる。

形質転換体の培養のために用いられる培地としては、通常、炭素源（例えば、グルコースやシュークロースのような炭水化物、酢酸のような有機酸、アルコール類等）、窒素源（例えば、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩等）および無機イオン（例えば、リン酸イオン、マグネシウムイオン、カリウムイオン、鉄イオン等）を含有する普通の培地が挙げられる。これに、ビタミン、ア

ミノ酸などの有機微量栄養素を添加すると、好ましい結果が得られる場合が多い。

さらに本発明の別の形態によると、前記 β -ラクタムアシラーゼ酵素を作用させる様態としては、当該形質転換体の培養液、菌体、菌体処理物、固定化菌体、菌体から抽出した酵素、固定化酵素などを挙げることができる。これらは、大規模なアシル化またはアシル基転換化工程で使用するすることができる。

菌体処理物としては、例えば、粗抽出液、培養菌体凍結乾燥体、アセトン乾燥体、リゾチームで処理した菌体、超音波破碎した菌体が挙げられる。

当該酵素含有液からは、公知のタンパク質あるいは酵素等の単離または精製方法により、さらに精製を行うことができる。例えば、硫安、食塩、硫酸ナトリウム等を添加する塩析沈殿法やアセトン等を添加する有機溶媒沈殿等の手段により沈殿物として本酵素を回収することができる。また、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー等の手段を組み合わせることにより精製することができる。

このようにして得られた当該 β -ラクタムアシラーゼはフェニル酢酸、フェノキシ酢酸、アモキシシリンによる酵素阻害をほとんど示さないという特徴的な性質を持つ。

さらに、これら菌体、菌体処理物、無細胞酵素抽出物、精製酵素は、公知の手段で固定化することができる。固定化は当業者に周知の方法である架橋法、共有結合法、物理的吸着法、包括法などで行うことができる。なお、固定化法については、例えばWO 96/20275に示される方法が参考になる。

固定化に使用される支持体としては、Duolite A568またはDS17186（ローム・アンド・ハース社：登録商標）などのフェノールホルムアルデヒド陰イオン交換樹脂、Amberlite IRA935、IRA945、IRA901（ローム・アンド・ハース社：登録商標）、Lewatit OC1037（バイエル社：登録商標）、Diaion EX-05（三菱化学：登録商標）などのポリスチレン樹脂のような各種アミンやアンモニウム塩あるいはジエタノールアミン型の官能基を持つ各種陰イオン交換樹脂が適している。その他、DEAE-セルロースなどの支持体も使用することができる。

さらに、酵素の吸着をより強固かつ安定にするため、通常、架橋剤を用いるが、

好適な例として、グルタルアルデヒドを挙げることができる。使用する酵素は、精製酵素だけでなく、菌体、菌体処理物、無細胞酵素抽出物など種々の精製度のものが使用できる。固定化菌体あるいは固定化酵素の調製は、菌体液あるいは酵素液を支持体を加えて攪拌して吸着させた後、架橋処理をする等の通常の調製法
5 が使用できる。

β-ラクタム系抗生物質は、β-ラクタム母核基質と側鎖基質を水や緩衝液などの媒質中で当該酵素と接触させる方法により合成することができる。この際用いる側鎖基質としては、エステル化合物およびその塩酸塩やアミド体を用いることができる。β-ラクタム系抗生物質がアモキシシリンである場合には、β-ラク
10 タム母核基質が6-アミノペニシラン酸（6-APA）であり、側鎖基質がD-
-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル（HPGOMe）等である。

すなわち、当該反応は、通常、菌体、菌体処理物、無細胞酵素抽出物、精製酵素またはそれらの固定化物を、基質を含む媒質中に溶解あるいは懸濁させ、または通過させることにより行うことができる。この反応は、例えば20～40℃で
15 30分から8時間程度反応させることによって行うことができる。

発明を実施するための最良の形態

以下の実施例により、本発明をさらに説明する。つまり、本発明の遺伝子、タンパク質、組換えベクター、形質転換体、β-ラクタム系抗生物質の生産等の実
20 施態様を以下に説明するが、本発明は下記実施態様に制限されるものではない。

材料及び方法

β-ラクタムアシラーゼ遺伝子のクローニング

全体的な遺伝子操作およびクローニング法は、Molecular Clon
25 ing (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されているように行った。DNA操作に使用した酵素、プラスミド及びイーコリ（E. coli）クローニング宿主は、市場の供給者から購入しその説明に従い使用した。

培地

B培地

ペプトン 5 g / l、イーストエキストラクト 5 g / l、 K_2HPO_4 2 g / l、シュクロース 20 g / l、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 g / l、グル
5 タミン酸ナトリウム 2 g / l、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g / l、pH 7.
2

LB培地

バクトトリプトン 10 g / l、イーストエキストラクト 5 g / l、NaC
10 l 5 g / l、pH 7.0

CM培地

肉エキス 10 g / l、イーストエキストラクト 5 g / l、NaCl 3
g / l、pH 7.0
15

緩衝液

1×SSC 0.15M NaCl、0.015M sodium citrate
30mM KPB (pH 6.0) 30mM KH_2PO_4 、KOHでpH 6.
20 0に調整
50mM KPB (pH 5.0) 50mM KH_2PO_4 、KOHでpH 5.
0に調整

菌株

25 ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12A株を、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) β -ラクタムアシラーゼ遺伝子の供与株として使用した。
エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α 株、エシ

エリヒア コリ (*Escherichia coli*) HB101株を組換えプラスミドの宿主として使用した。

シュードモナス リボフラビナ (*Pseudomonas riboflavina*) をバイオアッセイ菌として使用した。

5

β -ラクタムアシラーゼ活性

β -ラクタムアシラーゼの活性とは、アシル基が水によって脱離する場合には加水分解 (脱アシル) 活性をさし、可逆反応として活性化された側鎖基質から求核物質へのアシル基の転移を触媒する場合には転移活性をさす。

10 加水分解活性の場合、1ユニットは1分間あたり $1\ \mu\text{mole}$ のアモキシシリンの加水分解を触媒する酵素量とする。

転移活性の場合、1ユニットは1分間あたり $1\ \mu\text{mole}$ のアモキシシリンを合成する酵素量とする。

反応条件は以下に示し、定量はHPLCにより行った。

15

アモキシシリンの分解反応

アモキシシリンを 30 mM KPB (pH 6.0) に0.5%になるように溶かした液 $200\ \mu\text{l}$ に、(試験例1)の酵素液 $10\ \mu\text{l}$ を加え、 30°C で振とうしながら1時間反応させ、 1 N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止
20 させた。

アモキシシリン合成反応

6-アミノペニシラン酸 (6-APA)、HPGOMe·HClを 30 mM KPB (pH 6.0) に0.5%になるように溶かして基質液とした。菌体ある
25 いは粗酵素液を基質液に懸濁し、 30°C で4時間振とうしながら反応させた。 1 N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。

D-p-ヒドロキシフェニルグリシンメチルエステル (HPGOMe) 加水分解反応

HPGOMe・HClを30mM KPB (pH8.0)に0.5%になるように溶かして基質液とした。菌体あるいは粗酵素液を基質液に懸濁し、30℃で4時間振とうしながら反応させた。1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。

5

薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた検出

菌体反応、粗酵素反応における、アモキシシリンの検出を薄層クロマトグラフィーで行った。反応液を遠心して上清を回収してシリカゲル薄層プレートに微量スポットし、酢酸エチル：酢酸：水=60：20：20の展開溶媒にて展開させ、

10

溶媒除去後ニンヒドリン反応にてアモキシシリンを検出した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた検出

反応液を遠心して上清を回収し、移動相で10倍希釈してHPLCで測定した。分析条件は、カラムはコスモシル5C18 AR (ナカライテスク社) を用い、

15

移動相は1%アセトニトリル/50mM KPB (pH5.0)、流速1.0ml/min、カラム温度35℃、測定波長225nmで行った。ピークは標準品を用いて同定し、アモキシシリンの標準品として、アモキシシリン三水和物 (和光純薬) を用いた。保持時間は、HPG 1.8min、6-APA 5.9min、アモキシシリン 7.5min、HPGOMe・HCl 9.4min

20

であった。

(実施例1) ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12A株のβ-ラクタムアシラーゼの精製

25

KNK12A株をB培地を用いて30℃で増殖させた。以下の操作は、4℃で行った。細胞を遠心分離により回収し、0.1M Tris・HCl (pH8.0) に懸濁し、EDTA・2Naを4.7g/l、リゾチームを0.13g/lになるよう添加し、一晚攪拌した。MgSO₄・7H₂Oを3.13g/l、bovine pancreatic deoxyribonuclease I

を 0.06 mg/l になるように添加して一晩反応させ、菌体を超音波破碎し、上清を遠心分離で回収した。Ca(CH₃COO)₂·H₂O を 22.9 g/l、KH₂PO₄ を 22.9 g/l になるよう添加し、上清を遠心分離で回収した。透析後、陽イオン交換ゲルクロマトグラフ (CMセファロースCL-6B) を 3 回、ゲル濾過クロマトグラフ (セファクリル-300) を 1 回用いて精製を行った (Agric. Biol. Chem., 44 (5), 1069, 1980)。カラムから溶出された画分は TLC によりアモキシシリン合成活性を確認し、次の精製段階へ進めた。得られた SMACY タンパク質は、SDS-PAGE により約 70 kDa の分子量を示した。

10

(実施例 2) ステノトロフォモナス マルトフィリア (Stenotrophomonas maltophilia) KNK12A 株の β-ラクタムアシラーゼのアミノ酸配列の決定

上記 (実施例 1) の精製法で得られた SMACY タンパク質を、リジルエンド
15 ペプチダーゼにより限定分解し、ペプチド断片のアミノ酸配列を決定した。SMACY タンパク質をバッファー (10 mM Tris·HCl (pH 9.0)、4 M Urea) に懸濁してリジルエンドペプチダーゼを SMACY タンパク質の 1/50 量になるよう添加し、37℃で 6 時間反応させた。逆相カラム (YMC-Pack PROTEIN-RP (ワイエムシィ社)) にてペプチドを分取
20 し、Model 49X プロテインシーケンサー (アプライド・バイオシステム社) で解析を行った。得られたアミノ酸配列を、配列番号 3 に示した。

(実施例 3) ステノトロフォモナス マルトフィリア (Stenotrophomonas maltophilia) KNK12A 株の β-ラクタムアシラー
25 ゼ遺伝子のクローニング

ステノトロフォモナス マルトフィリア (Stenotrophomonas maltophilia) KNK12A 株のゲノム DNA を単離して NcoI で消化した 6-8 kbp のフラクションを、NcoI およびアルカリフォスファターゼ (CIAP) 処理した pSL301 プラスミド (インビトロジェン社) に

クローニングしたものを、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) HB101株に形質転換し、L-Ampプレート(LB培地にバクトアガー 15g/l、アンピシリン 50mg/lになるよう添加したもの)にまき、37℃で一晩培養した。このプレートのコロニーをナイロンメンブレンにレプリ
5 カし、コロニーが適当な大きさになるまで培養した後、菌体を溶菌してフィルターを作成した。配列番号3に含まれるアミノ酸配列で、配列番号5で示されるア
ミノ酸配列をコードする配列番号4に示されるK1オリゴヌクレオチドをプロー
ブとして用い、コロニーハイブリダイゼーションを行った。Gene Images
3'-oligo labelling (アマシャム ファルマシア バイ
10 オテック社)でK1オリゴヌクレオチドの3'末端を蛍光ラベルし、50℃のハイ
ブリダイゼーションバッファー(5×SSC、0.1% sodium dodecyl
sulfate、20倍希釈 liquid block (アマシャム
ファルマシア バイオテック社)、0.5% dextran sulphate)
中で一晩ハイブリダイズさせた。室温の5×SSC溶液(0.1% sodium
15 um dodecyl sulfate)、次いで42℃の1×SSC溶液(0.1% sodium
dodecyl sulfate)中でメンブレンを洗浄し、Gene Images CDP-Star
detection module (アマシャム ファルマシア バイオテック社)で検出を行い、陽性クロー
ンを得た。このクローンより得られたプラスミドをpSLKNK27とした。この
20 pSLKNK27には約6.3kbpのゲノム断片が挿入されていた。

(実施例4) β-ラクタムアシラーゼ遺伝子の配列決定

上記で得られた陽性クローンの配列を、BigDye Terminator
Cycle Sequencing FS Ready Reaction
25 Kit (アプライド・バイオシステム社)を用いたデオキシ配列決定によりシー
クエンシング反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライド・バイオシステム社)で解析を行った。得られたβ-
ラクタムアシラーゼ遺伝子配列を配列番号1に、予測されたアミノ酸配列を配列
番号2に示した。

(実施例5) β -ラクタムアシラーゼ遺伝子の発現ベクターの構築

pUC19プラスミドのlacZ遺伝子の開始コドン部位にNdeIサイトを
5 作製するプライマーを作製してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、pUC19プラスミドにNdeIサイトを1カ所加えたpUCNdeプラスミド
を作製した。pTrc99A(アマシャム ファルマシア バイオテック社)プ
ラスミドも同様にPCRを行い、NcoIサイトをNdeIサイトに変えた
pTrcNdeプラスミドを作製した。pUCNdeプラスミドをNdeI、
SspIで切断した2.0kbp断片と、pTrcNdeプラスミドをNdeI
10 I、SspIで切断した0.6kbp断片をライゲーションして、pUCNT
プラスミドを作製した(Journal of Bioscience and Bioengineering, 87, 149, 1999、WO94/03
613)。

pUCNTプラスミドをCrf10I、SspIで切断した1.8kbp
15 の断片と、pKC7プラスミド(Gene, 7, 79, 1979)をテンプレ
ートとしてカナマイシン耐性遺伝子をCrf10I、SspIサイトを持つよ
うにPCRで1.2kbpの断片を作製し、ライゲーションしてpUCNTkm
Tn5(kam^r)プラスミドを作製した。

次に、pSLKNK27をテンプレートとし、K-NdeI-4プライマー
20 (配列番号6: GGAATTCCATATGCATGTGCGTGCCGTAG
C)とK-BamHI-1プライマー(配列番号7: CGCGGATCCTC
AGTACACCGGCAGGTC)を用いてPCRを行って β -ラクタムアシ
ラーゼ構造遺伝子断片を増幅した。このDNA断片をpUCNTkmTn5(k
am^r)プラスミドベクターのNdeIサイトとBamHIサイトにクローニン
グし、pUCNTkmTn5-KNK-Lとした。この発現ベクターの構築図を
25 図1に示した。

(実施例6) β -ラクタムアシラーゼ遺伝子の発現

pUCNTkmTn5-KNK-LプラスミドをE. coli HB101に

形質転換した株 (pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101) をLB培地にカナマイシンを50mg/lになるよう添加したものにまき、30℃で一晩培養した。菌体を遠心分離で回収し、30mM KPBに懸濁した後、超音波破碎して上清を遠心分離で回収し、SDS-PAGEを行ったところ、約70kDa
5 のバンドが確認され、β-ラクタムアシラーゼが発現されていることが確認された。

(実施例7) β-ラクタムアシラーゼ活性の確認

pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101株を(実施例6)と同様に一
10 晩培養後、1mMになるようにIPTGを添加してさらに3時間培養した。菌体をLysozyme 0.44mg/mlで15分間氷上で処理し、超音波破碎、遠心した上清を粗酵素液とした。粗酵素液の総タンパク質量はブラッドフォード法にて定量した。基質(0.5%HPGOMe·HCl, 0.5%6-APA)
200μlに25μgのタンパク質を添加し、30℃で1時間振とうしながら反
15 応させ、10倍に希釈して10μlをHPLCで分析し、アモキシシリンのピークを検出した。これにより、pUCNTkmTn5プラスミドにクローニングされたステノトロフォモナス マルトフィリア(Stenotrophomonas maltophilia) KNK12A株β-ラクタムアシラーゼ遺伝子が
エシェリヒア コリ(Escherichia coli) HB101株で発現
20 され、活性を持つことが確認された。

(実施例8) β-ラクタムアシラーゼの精製

pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101株を(実施例1)のように培養し、細胞破碎した後、上清を遠心分離で回収した。この上清を0.45μmフ
25 イルターで濾過し、AKTA explorer 10Sシステム(アマシャムファルマシア バイオテック社)を用い、陽イオン交換ゲルクロマトグラフを行った。カラムから溶出された画分はTLCによりアモキシシリン合成活性を確認した。アモキシシリン合成活性を示した画分をSDS-PAGEを行ったところ、β-ラクタムアシラーゼがフラクションの総タンパク質の10%以上を占めるま

で精製が進んでいることが確認できたので、このフラクションを用いて以下の諸性質を調べた。

(試験例1) アモキシシリン合成活性の比較

- 5 ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12A株由来 β -ラクタムアシラーゼと既知のエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) PenG amidase (sigma社) のアモキシシリン合成活性を比較した。酵素液として、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas*
- 10 *s maltophilia*) KNK12A株由来 β -ラクタムアシラーゼは(実施例8) で得られたフラクション(酵素濃度 約 $3.2 \text{ ng}/10 \mu\text{l}$)、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) PenG amidaseは100倍希釈液($10.2 \text{ munit}/10 \mu\text{l}$ 、酵素濃度 約 $3.5 \text{ ng}/10 \mu\text{l}$)を用いた。
- 15 6-APA及びHPGOMe \cdot HClを30mM KPB (pH6.0)に0.5%になるように溶かした基質液 $200 \mu\text{l}$ に、酵素液 $10 \mu\text{l}$ を加え、 30°C で振とうしながら反応させた。反応開始から0、5、10、15、30、45、60、75、90、105、120分間後に1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。生成したアモキシシリンの検出はHPLCを用いて行
- 20 った。その結果を図3に示す。

この結果から、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12A株由来 β -ラクタムアシラーゼは、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) PenG amidaseと比較して、非常に高い変換率でアモキシシリンを合成す

25 ることがわかった。

(試験例2) フェニル酢酸 (PAA) とフェノキシ酢酸 (PXA) による合成活性阻害の比較

6-APA及びHPGOMe \cdot HClを30mM KPB (pH6.0)に0.

5 %になるように溶かした基質液 $200\mu\text{l}$ に、(試験例1)の酵素液 $10\mu\text{l}$ を加えた。PAAは0.3%、PXAは0.35%になるように加え、 30°C で振とうしながら1時間反応させ、1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。生成したアモキシシリンの検出はHPLCを用いて行った。それ

5 ぞれの酵素において、基質のみで反応させた時のアモキシシリン合成量を100%とする、相対活性を表した結果を表1に示す。

表1

10	<div>KNK12株由来 β-ラクタムアシラーゼ</div> <div>E. coli PenG amidase</div>
基質	100%
基質 + 0.3%PAA	107%
基質 + 0.35%PXA	76%

この結果から、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*)

15 PenG amidaseはフェニル酢酸又はフェノキシ酢酸によってアモキシシリンの合成が阻害されるが、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12A株由来 β -ラクタムアシラーゼは、まったく阻害されないか、又は、阻害されたとしてもわずかであることがわかった。

20

(試験例3) アモキシシリンの分解活性

アモキシシリンを30mM KPB (pH6.0)に0.5%になるように溶かした液 $200\mu\text{l}$ に、(試験例1)の酵素液 $10\mu\text{l}$ を加え、 30°C で振とうしながら1時間反応させ、1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止

25 させた。残存したアモキシシリンの検出はHPLCを用いて行った。その結果を図4に示す。

この結果から、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) PenG amidaseがアモキシシリンを非常に素早く分解するのに対して、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas*

maltophilia) KNK12A株由来β-ラクタムアシラーゼはアモキシシリンの分解速度が遅いことがわかった。

(試験例4) HPGOMeの分解活性の比較

- 5 HPGOMe・HClを30mM KPB (pH6.0)に0.5%になるように溶かした液200μlに、(試験例1)の酵素液10μlを加え、30℃で振とうしながら1時間反応させ、1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止させた。残存したHPGOMeの検出はHPLCを用いて行った。その結果を図5に示す。
- 10 この結果から、ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12A株由来β-ラクタムアシラーゼは、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) PenG amidaseに対して、HPGOMeの分解速度が速いことがわかった。

15 (実施例9) β-ラクタムアシラーゼの樹脂への固定化

- pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101株を(実施例7)と同様に培養後、菌体破砕処理を行い粗酵素液を調製した。これに、0.1M KPB (pH7.0)で平衡化したDuoliteA-568(ローム・アンド・ハース社)を、総タンパク質40mgに対して樹脂1gになるように添加し、窒素シール下、4℃で20時間攪拌し、吸着させた。この吸着樹脂を0.1M KPB (pH7.0)および10mMジチオスレイトール(DTT)で洗浄後、0.2% グルタルアルデヒド、0.1M KPB (pH7.0)で4℃、10分間反応させてタンパク質を架橋し、固定化樹脂を作製した。この樹脂を基質(0.5% HPGOMe・HCl 0.5% 6-APA)200μlに対し1mg
- 20 添加し、30℃で4時間振とうしながら反応させ、10倍に希釈して10μlをHPLCで分析し、アモキシシリンのピークを検出した。

(実施例10) ランダム変異導入アシラーゼ酵素組換え体ライブラリーの作製

pUCNTkmTn5-KNK-Lプラスミドをテンプレートとし、MT-1

9 7プライマー（配列番号8：AAAAAGCAGGCTGGGCACGACAG
GTTTCCCGACTGGA）とMT-198プライマー（配列番号9：AG
AAAGCTGGGTGGATCCTCAGTACACCGGCAGGTCGA
）とを使用してPCRを行った。反応にはDiversify PCR Ran
5 dom Mutagenesis Kit（クロンテック社）を使用した。0.
2mlのマイクロチューブに1ngのテンプレートとそれぞれ10pmoleの
プライマーを加え、キットに付属のバッファーを5 μ l、Diversify
dNTP Mixを1 μ l、TITANIUM Taq Polymerase
を添加した。また、8mM MnSO₄溶液を0から4 μ lまで、2mM dG
10 TP溶液を1から5 μ lまで添加量を変えることでランダム変異個数を長さ1k
bpあたり2.0から8.1個となるよう調整した。滅菌水を加えて反応液量を5
0 μ lに合わせた後に、94℃30秒・68℃2分の反応を25サイクル行って
DNAの増幅と変異導入を行った。

ランダム変異導入したDNAをテンプレートとし、attB1プライマー（配
15 列番号10：GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT）
とattB2プライマー（配列番号11：GGGGACCACTTTGTACA
AGAAAGCTGGGT）とを使用して定法に従いPCRを行った。得られた
DNA断片130ngと、Gateway Cloning System（イ
ンビトロジェン社）に付属のpDONR（インビトロジェン社）を300ng、
20 バッファーを4 μ l、BP Clonase 4 μ lを混合して、滅菌水で反応
液量を20 μ lに合わせてから25℃で1時間の反応の後に、2 μ lのProt
einase Kを添加して37℃で10分の反応を行った。

（実施例11）ランダム変異株のスクリーニング

25 ランダム変異導入DNAライブラリーでE. coli DH5 α を形質転換し
て、カナマイシンを25mg/Lになるように添加したLB寒天平板培地にコロ
ニーが1枚あたり100個程度になるようにまき、37℃で一晩静置培養した。
生じたコロニーをベルベットでカナマイシン含有CM寒天平板培地2枚にレプリ
カし、再び37℃で一晩静置培養した。レプリカしたプレートの1枚に、42℃

に保温しておいた 7 ml の CM 軟寒天培地に 0.02% の HPGOMe · HCl と 0.01% の 6-APA、0.3% の *Pseudomonas riboflavin* CM 培地終夜培養液を混合して重層し、固化した後に 28℃ で一晚静置培養を行った。*Pseudomonas riboflavin* の生育阻止円が現れたコロニーをアモキシシリンが生成されたポジティブ株とした。

ポジティブ株をレプリカプレートから 10 ml の CM 培地に植菌して、37℃ で一晚しんとう培養した。2 ml の培養液から菌体を遠心分離で回収し、pH 6.0 の 30 mM KPB に懸濁した後に 1 ml の基質 (30 mM KPB に 0.5% HPGOMe · HCl、0.5% 6-APA を溶解させて pH 6.0 に調整) に混合して 30℃ で 1 時間反応させた。50 μ l の 1 N HCl を加えて反応を停止した後、遠心した上清を 30 mM KPB で 25 倍に希釈して 10 μ l を HPLC で分析した。数万個の変異株の中から、生成アモキシシリン/副生成 HPG の比率がコントロールの組み換え β -ラクタムアシラーゼ生産株 pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101 株と比べて約 2 倍に向上した変異株 0902-2-1 株を取得した。得られた変異株の保持するプラスミドを通常のアルカリ法で調製した。BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライド・バイオシステムズ社) を用いてシーケンシング反応を行い、その配列を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライド・バイオシステムズ社) で解析を行った。得られた塩基配列情報より、配列番号 1 で示される β -ラクタムアシラーゼ構造遺伝子中 735 番目アデニンのグアニンへの変異が明らかになり、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の 204 番目のメチオニンがバリンに変異していることが明らかになった。

25 (実施例 12) 変異型アシラーゼ発現ベクターの作製

変異株 0902-2-1 株の保持するプラスミドをテンプレートにし、MT-216 プライマー (配列番号 12: CGCCTCTAGAAGCGATTTCGC CGCGCATGCGCGACC) と MT-219 プライマー (配列番号 13: GCACAAGCTTCTTCCACCAGGTCAGCTGG) とを使用して

PCRを行った。得られた約570bpのDNA断片を制限酵素XbaIとHindIIIとで完全消化した。

一方、pUCNTkmTn5-KNK-Lプラスミドをテンプレートにし、MT-217プライマー（配列番号14：TCGCTTCTAGAGGCGCGG
5 CCGGCAGCATCGTAGGGC）とMT-218プライマー（配列番号
15：GGAAGAAGCTTGTGCAGCACCCGGCC）とを使用して
PCRを行った。得られた約4.4kbpのDNA断片を制限酵素XbaIで完全消化し、HindIIIで部分消化した。

両者を混合してライゲーション反応を行い、エシェリヒア コリ（E s c h e
10 r i c h i a c o l i）HB101を形質転換した。得られたカナマイシン耐
性コロニーからアルカリ法でプラスミドを調製し、1アミノ酸置換変異アシラー
ゼ遺伝子をコードする変異プラスミドpUCNT-Tn5-MuKNK-L1を
作製した。この発現ベクターを図2に示した。

15 （実施例13） 変異型アシラーゼの能力比較試験

β -ラクタムアシラーゼ生産株 pUCNTkmTn5-KNK-L/HB1
01株と1アミノ酸置換変異 β -ラクタムアシラーゼ生産株 pUCNT-Tn
5-MuKNK-L1/HB101株を10mlのCM培地に植菌して、37℃
で一晩振盪培養した。2mlの培養液から菌体を遠心分離で回収し、pH6.0
20 の30mM KPBに懸濁した後に1mlの基質（30mM KPBに0.5%
HPGOMe·HCl、0.5% 6-APAを溶解させてpH6.0に調整
）に混合して30℃で反応させた。反応開始から10、20、30、60、90、
180分後に1N HClを基質液の1/20量加えて反応を停止した後、遠心
した上清を30mM KPBで25倍に希釈して10 μ lをHPLCで分析した。
25 そのアモキシリン変換効率比較を図6に、D-p-ヒドロキシフェニルグリシ
ンメチルエステル（HPGOMe）のエステル分解度比較を図7に示す。

産業上の利用可能性

ステノトロフォモナス（*Stenotrophomonas*）属 β -ラクタム

- アシラーゼ遺伝子或いは基質分解活性を低減させアシラーゼ活性を増強させた該
改変遺伝子を発現ベクターに結合して宿主中で発現させることにより、効率よく
 β -ラクタムアシラーゼ或いは改変 β -ラクタムアシラーゼを調製することがで
きる。この β -ラクタムアシラーゼ或いは改変 β -ラクタムアシラーゼを利用し
5 て、大量の脱アシル化／アシル基転換化の工程に使用することができ、たとえば、
アモキシシリンの酵素的生産法に利用することができる。

請求の範囲

1. ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物が産生する β -ラクタムアシラーゼ。

5

2. ステノトロフォモナス マルトフィリア (*Stenotrophomonas maltophilia*) KNK12A株が産生する β -ラクタムアシラーゼ。

10 3. 配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子。

4. 配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンがバリンであるタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子。

15

5. 配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンが置換されたタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子。

6. 配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が
20 欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子。

7. 配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを含む遺伝子。

25

8. 配列番号1で示される塩基配列において、配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号2で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするDNAを含む遺伝子。

9. ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物から単離された請求の範囲第 3 ~ 8 項のいずれかに記載の遺伝子。

10. 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質を生産し、ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物。

11. 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

10

12. 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 204 番目のメチオニンがバリンであるタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

13. 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 204 番目のメチオニンが置換されたタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

15

14. 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

20

15. 配列番号 2 で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつ β -ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

16. 配列番号 1 で示される塩基配列において、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列をコードする部分に対応する塩基配列が、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

25

17. 配列番号 1 で示される塩基配列を含むポリヌクレオチド。

18. ステノトロフォモナス (*Stenotrophomonas*) 属に属する微生物から単離された請求の範囲第11～17項のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

5

19. 配列番号2で示されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列からなるタンパク質。

20. 配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンがバリンであるアミノ酸配列からなるタンパク質。

10

21. 配列番号2で示されるアミノ酸配列において204番目のメチオニンが置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

22. 配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつβ-ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質。

15

23. 配列番号2で示されるアミノ酸配列において、翻訳後修飾され、かつβ-ラクタムアシラーゼ活性を有するタンパク質。

20

24. 請求の範囲第3～9項のいずれかに記載の遺伝子に含まれる転写調節配列を含む遺伝子。

25. 請求の範囲第3～9項のいずれかに記載の遺伝子に含まれる翻訳調節配列を含む遺伝子。

25

26. 転写及び／又は翻訳調節配列を含むレギュロンの制御下にある請求の範囲第3～9のいずれかに記載の遺伝子であって、当該調節配列の一方又は両方が

それぞれ同じ又は異なる生物から得られた他の転写及び／又は翻訳調節配列に置き換えられている遺伝子。

27. 請求の範囲第3、4、5、6、7、8、9又は26項に記載の遺伝子を
5 1以上含む組換えベクター。

28. 請求の範囲第27項記載の組換えベクターで宿主を形質転換してなる形質転換体。

10 29. 宿主がグラム陰性微生物である請求の範囲第28項記載の形質転換体。

30. 宿主がグラム陽性微生物である請求の範囲第28項記載の形質転換体。

31. pUCNTkmTn5-KNK-L/HB101 (FERM BP-8
15 362) である請求の範囲第28項記載の形質転換体。

32. pUCNTTn5-MuKNK-L1/HB101 (FERM BP-8369) である請求の範囲第28項記載の形質転換体。

20 33. 請求の範囲第28～32項のいずれかに記載の形質転換体を培養し、当該形質転換体が産生した β -ラクタムアシラーゼを回収することを特徴とする、 β -ラクタムアシラーゼの製造方法。

34. 請求の範囲第11～18項のいずれかに記載のポリヌクレオチドにより
25 コードされたアミノ酸配列からなる β -ラクタムアシラーゼ。

35. 請求の範囲第10項記載の微生物、または請求の範囲第28～32項のいずれかに記載の形質転換体を培養し、その菌体、菌体混合培養液、菌体の破砕物、もしくは、菌体から抽出精製された β -ラクタムアシラーゼ、を固定化して

なる固定化 β -ラクタムアシラーゼ。

36. 請求の範囲第27項記載の組換えベクターを調製し、当該組換えベクターで宿主を形質転換し、得られた形質転換体をクローン化し選択することからなる、形質転換体中で β -ラクタムアシラーゼを産生する又はその産生を増強する方法。

37. 請求の範囲第34項記載の β -ラクタムアシラーゼにより β -ラクタム系抗生物質を製造する方法。

10

38. β -ラクタム系抗生物質がアモキシシリンである請求の範囲第37項記載の製造方法。

15

1 / 4

図 1

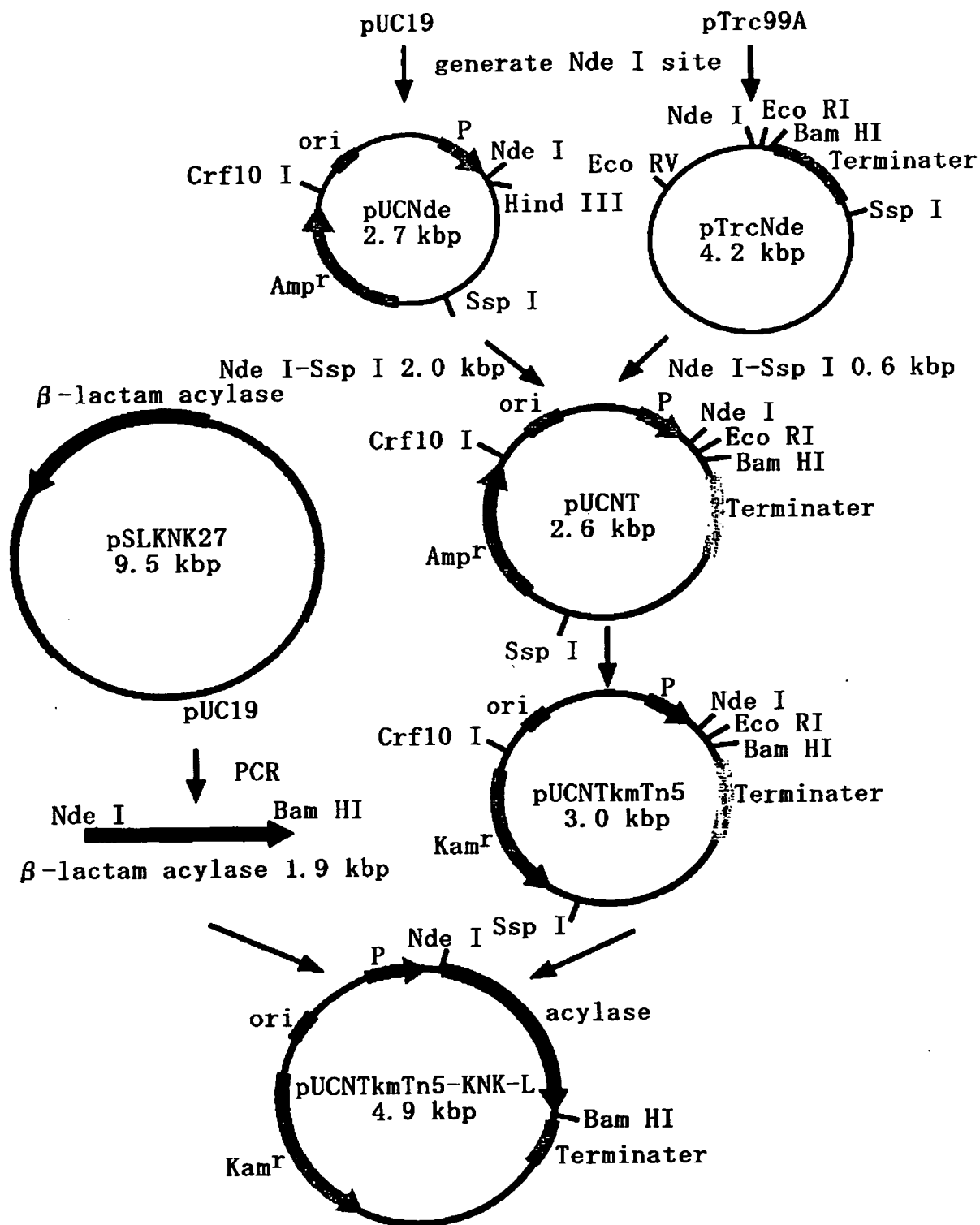


図 2

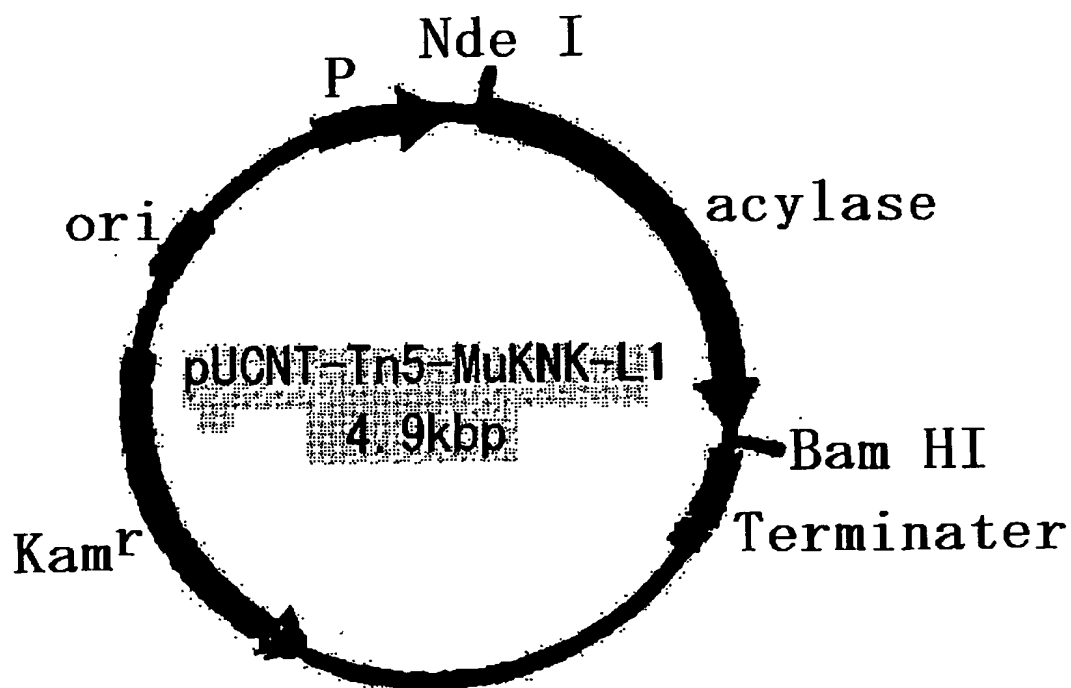


図 3

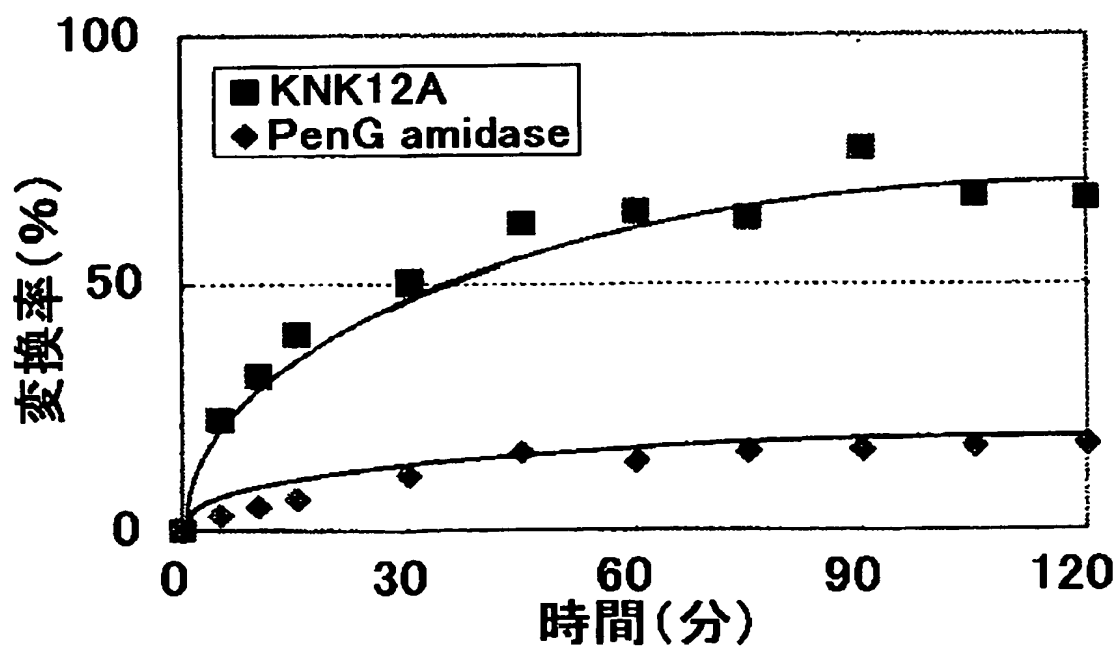


図 4

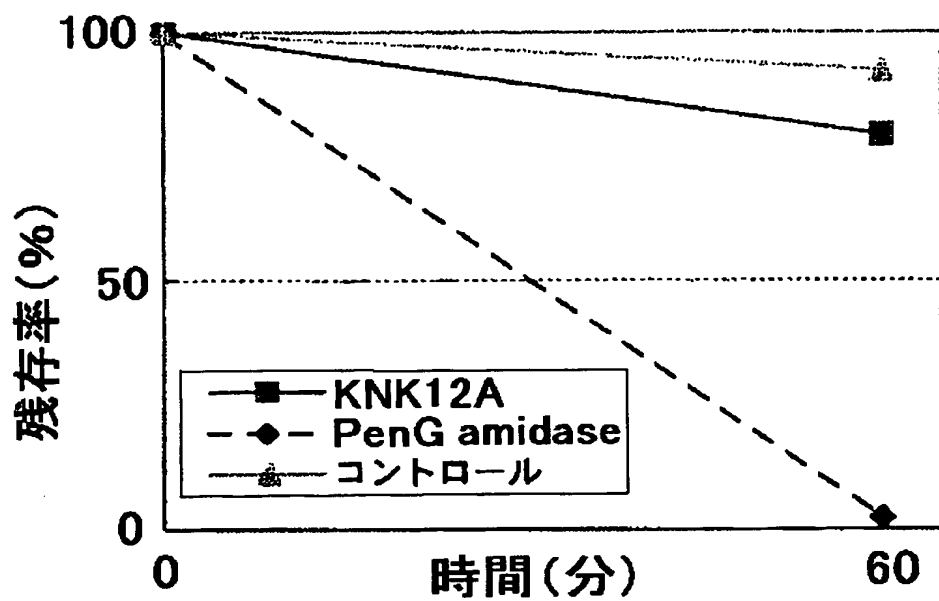


図 5

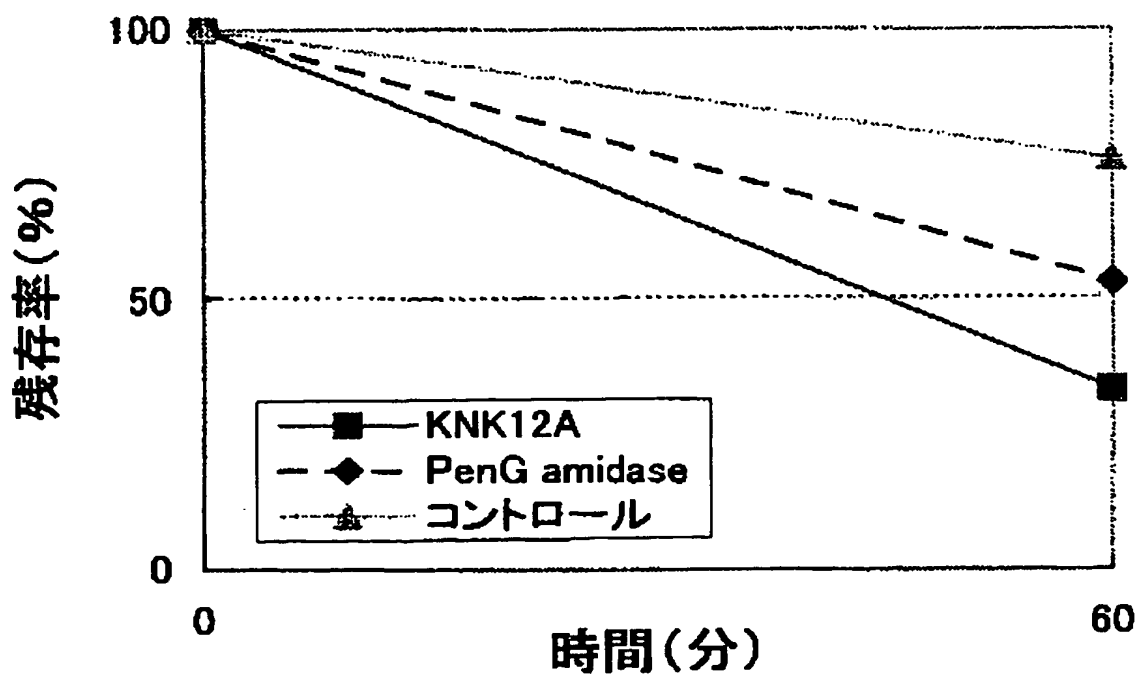


図 6

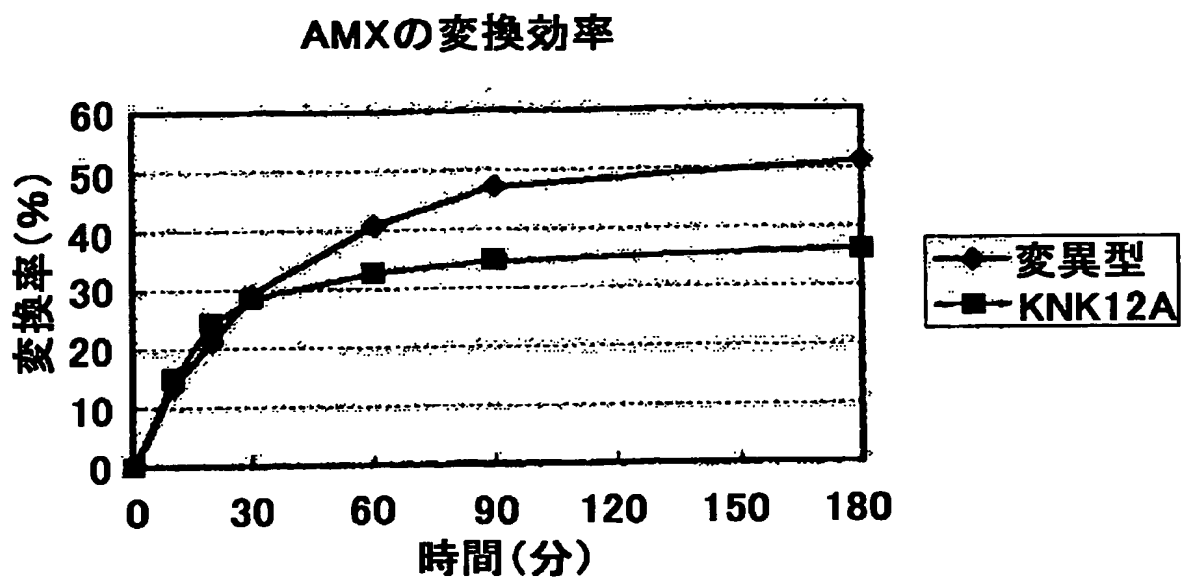
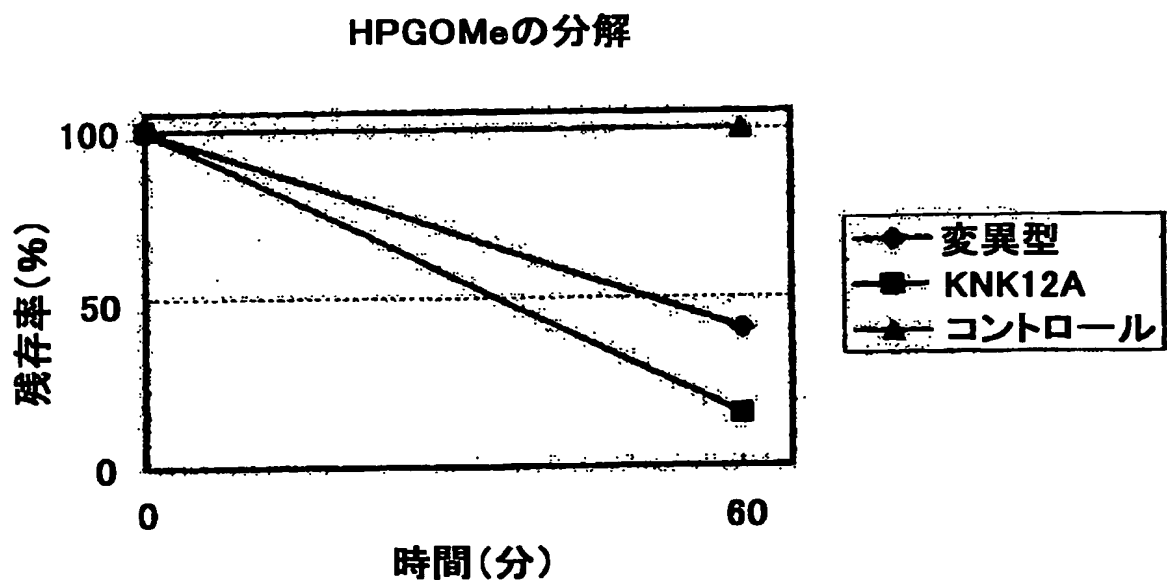


図 7



SEQUENCE LISTING

<110> 鐘淵化学工業株式会社 KANEKA CORPORATION

<120> 新規アシラーゼ遺伝子

<130> T719. /ACYL-1

<150> JP P2002-165722

<151> 2002-06-06

<160> 15

<210> 1

<211> 2529

<212> DNA

<213> *Stenotrophomonas maltophilia*

<220>

<221> CDS

<222> (126)... (2036)

<400> 1

tctacaacgg cttggcacat gtgccatcag tcctaccccc aaagagcgca gaacgcaaag 60

cctgcacaca cttcaccgc cggggcagga gtacgcttgg gactttcctg cccgaggggt 120

cgtcc atg cat gtg cgt gcc gta gca gtt gcc atc gcc ctg agc ctg tcc 170

Met His Val Arg Ala Val Ala Val Ala Ile Ala Leu Ser Leu Ser

1

5

10

15

agc acc gtg ctg gcc gcc gac acc ccg ccg atg acc ccg gac atc agc 218

Ser Thr Val Leu Ala Ala Asp Thr Pro Pro Met Thr Pro Asp Ile Ser

20

25

30

2/13

ggc aag cct ttc att gcg ccc gat gtc ggc cgc gac tac gac aag cgc	266
Gly Lys Pro Phe Ile Ala Pro Asp Val Gly Arg Asp Tyr Asp Lys Arg	
35 40 45	
gtg gtg atg gtg ccg atg cgc gac ggt acc agg ctg tac acg gtg atc	314
Val Val Met Val Pro Met Arg Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Thr Val Ile	
50 55 60	
gtg gtg ccc aag ggc gcg cac aat gcc ccg atc ctg ctg acc cgc acg	362
Val Val Pro Lys Gly Ala His Asn Ala Pro Ile Leu Leu Thr Arg Thr	
65 70 75	
ccc tac gat gct gcc ggc cgc gcc agc cgc agc gat tcg ccg cgc atg	410
Pro Tyr Asp Ala Ala Gly Arg Ala Ser Arg Ser Asp Ser Pro Arg Met	
80 85 90 95	
cgc gac ctg ctg ccg cag ggg gat gaa gtc ttc gtc gat ggc ggc tat	458
Arg Asp Leu Leu Pro Gln Gly Asp Glu Val Phe Val Asp Gly Gly Tyr	
100 105 110	
atc cgc gtg ttc cag gac atc cgg ggc aag tac ggt tcg gaa ggc gat	506
Ile Arg Val Phe Gln Asp Ile Arg Gly Lys Tyr Gly Ser Glu Gly Asp	
115 120 125	
tat gtg atg acc cgg ccg ctg cgc ggg ccg ttg aac aac acc aag gtc	554
Tyr Val Met Thr Arg Pro Leu Arg Gly Pro Leu Asn Asn Thr Lys Val	
130 135 140	
gac cac tcc acc gat gca tgg gac acc atc gac tgg ttg gtg aaa cac	602
Asp His Ser Thr Asp Ala Trp Asp Thr Ile Asp Trp Leu Val Lys His	
145 150 155	
gtg ccg gaa agc aac ggc aag gtc ggc atg ctg ggc tcg tcg tac gaa	650
Val Pro Glu Ser Asn Gly Lys Val Gly Met Leu Gly Ser Ser Tyr Glu	
160 165 170 175	

3/13

ggc ttc acc gtg gtg atg gcc ctg acc gac ccg cat ccg gcg ctg aag	698
Gly Phe Thr Val Val Met Ala Leu Thr Asp Pro His Pro Ala Leu Lys	
180 185 190	
gtg gcc gcc ccg cag agc ccg atg gtc gat ggc tgg atg ggc gac gac	746
Val Ala Ala Pro Gln Ser Pro Met Val Asp Gly Trp Met Gly Asp Asp	
195 200 205	
tgg ctc aac tac ggg gcc ttc cgc cag gtc aat ttc aac tac ttc gca	794
Trp Leu Asn Tyr Gly Ala Phe Arg Gln Val Asn Phe Asn Tyr Phe Ala	
210 215 220	
atg cag acc gag aag cgc gcc aag ggc acg ccg ctg ccc agc ctg ggc	842
Met Gln Thr Glu Lys Arg Gly Lys Gly Thr Pro Leu Pro Ser Leu Gly	
225 230 235	
tac gac gac tac agc acc ttc ctg cgc atc ggt tcg gcc ggt gac tac	890
Tyr Asp Asp Tyr Ser Thr Phe Leu Arg Ile Gly Ser Ala Gly Asp Tyr	
240 245 250 255	
gca cgc ttc acc gcc gtg gac cag ctg acc tgg tgg aag aag ctg gtg	938
Ala Arg Phe Thr Gly Val Asp Gln Leu Thr Trp Trp Lys Lys Leu Val	
260 265 270	
cag cac ccg gcc tac gat gcc ttc tgg cag gcc cag gcg ctg gat gcg	986
Gln His Pro Ala Tyr Asp Gly Phe Trp Gln Gly Gln Ala Leu Asp Ala	
275 280 285	
gtg atg gcg aag acc ccg ctg aag gtg ccg acc atg tgg ctg cag gcc	1034
Val Met Ala Lys Thr Pro Leu Lys Val Pro Thr Met Trp Leu Gln Gly	
290 295 300	
ctg tgg gac cag gaa gac atg tgg gcc gcc aac cat gcc tac cag gcg	1082
Leu Trp Asp Gln Glu Asp Met Trp Gly Ala Asn His Ala Tyr Gln Ala	
305 310 315	

atg gaa ggc cgc gac acc ggc aat acc cac aat tac ctg gtg atg ggc 1130
Met Glu Gly Arg Asp Thr Gly Asn Thr His Asn Tyr Leu Val Met Gly
320 325 330 335

ccg tgg cgg cac agc cag gtg aac tac acc ggc aac gag ctg ggt gcg 1178
Pro Trp Arg His Ser Gln Val Asn Tyr Thr Gly Asn Glu Leu Gly Ala
340 345 350

ctg aag ttc gag ggc gat acc gcg ctg cag ttc cgc cgc gat gtg ctc 1226
Leu Lys Phe Glu Gly Asp Thr Ala Leu Gln Phe Arg Arg Asp Val Leu
355 360 365

aag ccg ttc ttc gac cag tac ctg gtg gat ggc gca ccg aag gcc gac 1274
Lys Pro Phe Phe Asp Gln Tyr Leu Val Asp Gly Ala Pro Lys Ala Asp
370 375 380

acg ccg ccg gtg ctc atc tac aac acc ggc gaa aac cac tgg gat cgc 1322
Thr Pro Pro Val Leu Ile Tyr Asn Thr Gly Glu Asn His Trp Asp Arg
385 390 395

ctg cag ggc tgg ccg cgc agt tgc gac aag ggc tgc acg gcg gcc agc 1370
Leu Gln Gly Trp Pro Arg Ser Cys Asp Lys Gly Cys Thr Ala Ala Ser
400 405 410 415

aag ccg ctg tac ctg cgt gcc ggt ggc aag ctg gcc ttc cag gca ccg 1418
Lys Pro Leu Tyr Leu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ala Phe Gln Ala Pro
420 425 430

gcg gcg ggt gaa ggt gat ttc gag gaa tac gtg tcc gac ccg gcc aag 1466
Ala Ala Gly Glu Gly Asp Phe Glu Glu Tyr Val Ser Asp Pro Ala Lys
435 440 445

ccg gtg ccg ttc gtg ccg cgc ccg gtg cgt ttt ggc gac cgt gac atg 1514
Pro Val Pro Phe Val Pro Arg Pro Val Arg Phe Gly Asp Arg Asp Met
450 455 460

5/13

tgg acc acg tgg ctg gtg aag gac caa cgt ttt gtc gat ggt cgt ccg 1562
 Trp Thr Thr Trp Leu Val Lys Asp Gln Arg Phe Val Asp Gly Arg Pro
 465 470 475

gat gtg ctg acc ttc atc acc gaa ccg ctg gcc gag ccg ctg cgg atc 1610
 Asp Val Leu Thr Phe Ile Thr Glu Pro Leu Ala Glu Pro Leu Arg Ile
 480 485 490 495

ggc ggc gcg ccg gtg gtg cat ctg cag gcg tcc acc agt ggc acc gac 1658
 Gly Gly Ala Pro Val Val His Leu Gln Ala Ser Thr Ser Gly Thr Asp
 500 505 510

agc gac tgg gtg gtg aag ctg atc gac gtc tac ccg gat cag gaa gcg 1706
 Ser Asp Trp Val Val Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Asp Gln Glu Ala
 515 520 525

tca acg ccg gaa atg ggt ggc tat gag ctg ccg gtg tcg ctg gcg atc 1754
 Ser Thr Pro Glu Met Gly Gly Tyr Glu Leu Pro Val Ser Leu Ala Ile
 530 535 540

ttc cgt ggg cgc tat cgg gag agt ttc agc gac ccg aag ccg ctg gca 1802
 Phe Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Ser Phe Ser Asp Pro Lys Pro Leu Ala
 545 550 555

gcg aac cag gtg ctg ccg tac cgc ttt gat ctg ccc aat gcc aac cat 1850
 Ala Asn Gln Val Leu Pro Tyr Arg Phe Asp Leu Pro Asn Ala Asn His
 560 565 570 575

gtg ttc cag aag ggg cac cgg gtg atg gtg cag gtg cag tcc agc ctg 1898
 Val Phe Gln Lys Gly His Arg Val Met Val Gln Val Gln Ser Ser Leu
 580 585 590

ttc ccg ctg tat gac cgc aac ccg cag acc tac gtg ccg aac atc tac 1946
 Phe Pro Leu Tyr Asp Arg Asn Pro Gln Thr Tyr Val Pro Asn Ile Tyr
 595 600 605

6/13

ctg gcc aag ccg ggc gat tac cag aag gcc acg cag cgg gtg tgg cac 1994
Leu Ala Lys Pro Gly Asp Tyr Gln Lys Ala Thr Gln Arg Val Trp His
610 615 620

agc gcc gcg cag gcg agc tac gtc gac ctg ccg gtg tac tga 2036
Ser Ala Ala Gln Ala Ser Tyr Val Asp Leu Pro Val Tyr
625 630 635

ggcggagaat ggcgtggttag tgccggccgc tggccggcaa cgcggagcgg tagcgcggg 2096

ccatgcccgg cggatgggggt agtgccggcc gctggccggc aacgcggtga agccggcgcg 2156

tgtcgaccaa ggccgacacc tgccagagca cgtcagccta ccttcgaggg accggtgcgc 2216

cagcggctgg gaaccagacc gaagcgcttg cggaaggcgg cggcgaagtt gctgggggtg 2276

cggtagccgg tggcgccgc cgctgttca acgtccagc cgtgttcgcg caggccgcgt 2336

tggcggtggt gcatgcgttg ttcgtgcagg tagtcgaaca ccgagcacc gtattgctgc 2396

acgaagtggc ggccgacgca gctgggactc atgcaggcca gctgggccag ttccaccagg 2456

ctgtgggcgt ggctgggatc gtcgtgcagg aagccccgca cgcgttcaat cgggccaaagt 2516

tggccgcgcc aaa 2529

<210> 2

<211> 636

<212> PRT

<213> Stenotrophomonas maltophilia

<400> 2

Met His Val Arg Ala Val Ala Val Ala Ile Ala Leu Ser Leu Ser Ser
1 5 10 15
Thr Val Leu Ala Ala Asp Thr Pro Pro Met Thr Pro Asp Ile Ser Gly

7/13

20	25	30
Lys Pro Phe Ile Ala Pro Asp Val Gly Arg Asp Tyr Asp Lys Arg Val		
35	40	45
Val Met Val Pro Met Arg Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Thr Val Ile Val		
50	55	60
Val Pro Lys Gly Ala His Asn Ala Pro Ile Leu Leu Thr Arg Thr Pro		
65	70	75
Tyr Asp Ala Ala Gly Arg Ala Ser Arg Ser Asp Ser Pro Arg Met Arg		
85	90	95
Asp Leu Leu Pro Gln Gly Asp Glu Val Phe Val Asp Gly Gly Tyr Ile		
100	105	110
Arg Val Phe Gln Asp Ile Arg Gly Lys Tyr Gly Ser Glu Gly Asp Tyr		
115	120	125
Val Met Thr Arg Pro Leu Arg Gly Pro Leu Asn Asn Thr Lys Val Asp		
130	135	140
His Ser Thr Asp Ala Trp Asp Thr Ile Asp Trp Leu Val Lys His Val		
145	150	155
Pro Glu Ser Asn Gly Lys Val Gly Met Leu Gly Ser Ser Tyr Glu Gly		
165	170	175
Phe Thr Val Val Met Ala Leu Thr Asp Pro His Pro Ala Leu Lys Val		
180	185	190
Ala Ala Pro Gln Ser Pro Met Val Asp Gly Trp Met Gly Asp Asp Trp		
195	200	205
Leu Asn Tyr Gly Ala Phe Arg Gln Val Asn Phe Asn Tyr Phe Ala Met		
210	215	220
Gln Thr Glu Lys Arg Gly Lys Gly Thr Pro Leu Pro Ser Leu Gly Tyr		
225	230	235
Asp Asp Tyr Ser Thr Phe Leu Arg Ile Gly Ser Ala Gly Asp Tyr Ala		
245	250	255
Arg Phe Thr Gly Val Asp Gln Leu Thr Trp Trp Lys Lys Leu Val Gln		
260	265	270
His Pro Ala Tyr Asp Gly Phe Trp Gln Gly Gln Ala Leu Asp Ala Val		
275	280	285
Met Ala Lys Thr Pro Leu Lys Val Pro Thr Met Trp Leu Gln Gly Leu		
290	295	300
Trp Asp Gln Glu Asp Met Trp Gly Ala Asn His Ala Tyr Gln Ala Met		

305	310	315	320
Glu Gly Arg Asp Thr Gly Asn Thr His Asn Tyr Leu Val Met Gly Pro			
	325	330	335
Trp Arg His Ser Gln Val Asn Tyr Thr Gly Asn Glu Leu Gly Ala Leu			
	340	345	350
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Ala Leu Gln Phe Arg Arg Asp Val Leu Lys			
	355	360	365
Pro Phe Phe Asp Gln Tyr Leu Val Asp Gly Ala Pro Lys Ala Asp Thr			
	370	375	380
Pro Pro Val Leu Ile Tyr Asn Thr Gly Glu Asn His Trp Asp Arg Leu			
385	390	395	400
Gln Gly Trp Pro Arg Ser Cys Asp Lys Gly Cys Thr Ala Ala Ser Lys			
	405	410	415
Pro Leu Tyr Leu Arg Ala Gly Gly Lys Leu Ala Phe Gln Ala Pro Ala			
	420	425	430
Ala Gly Glu Gly Asp Phe Glu Glu Tyr Val Ser Asp Pro Ala Lys Pro			
	435	440	445
Val Pro Phe Val Pro Arg Pro Val Arg Phe Gly Asp Arg Asp Met Trp			
	450	455	460
Thr Thr Trp Leu Val Lys Asp Gln Arg Phe Val Asp Gly Arg Pro Asp			
465	470	475	480
Val Leu Thr Phe Ile Thr Glu Pro Leu Ala Glu Pro Leu Arg Ile Gly			
	485	490	495
Gly Ala Pro Val Val His Leu Gln Ala Ser Thr Ser Gly Thr Asp Ser			
	500	505	510
Asp Trp Val Val Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Asp Gln Glu Ala Ser			
	515	520	525
Thr Pro Glu Met Gly Gly Tyr Glu Leu Pro Val Ser Leu Ala Ile Phe			
	530	535	540
Arg Gly Arg Tyr Arg Glu Ser Phe Ser Asp Pro Lys Pro Leu Ala Ala			
545	550	555	560
Asn Gln Val Leu Pro Tyr Arg Phe Asp Leu Pro Asn Ala Asn His Val			
	565	570	575
Phe Gln Lys Gly His Arg Val Met Val Gln Val Gln Ser Ser Leu Phe			
	580	585	590
Pro Leu Tyr Asp Arg Asn Pro Gln Thr Tyr Val Pro Asn Ile Tyr Leu			

9/13

595 600 605
Ala Lys Pro Gly Asp Tyr Gln Lys Ala Thr Gln Arg Val Trp His Ser
610 615 620
Ala Ala Gln Ala Ser Tyr Val Asp Leu Pro Val Tyr
625 630 635

<210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> Stenotrophomonas maltophilia

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)... (25)

<400> 3
Val Pro Thr Met Trp Leu Gln Gly Leu Trp Asp Gln Glu Asp Met Trp
1 5 10 15

Gly Ala Asn His Ala Tyr Gln Ala Met
20 25

<210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: K1 primer

<400> 4
tgggaycarg argayatgtg ggg

10/13

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> *Stenotrophomonas maltophilia*

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)... (8)

<400> 5

Trp Asp Gln Glu Asp Met Trp Gly

1

5

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: K-Nde I-4 primer

<400> 6

ggaattccat atgcatgtgc gtgccgtagc

30

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: K-BamH I-1 primer

<400> 7

cgcggtacct cagtacaccg gcaggtc

27

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: MT-197 primer

<400> 8

aaaaagcagg ctggcacgac aggtttcccg actgga

36

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: MT-198 primer

<400> 9

agaaagctgg gtggatcctc agtacaccgg caggtcga

38

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: attB1 primer

<400> 10

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggct

29

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: attB2 primer

<400> 11

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggt

29

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: MT-216 primer

<400> 12

cgccctctaga agcgattcgc cgcgcatgcg cgacc

35

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: MT-219 primer

<400> 13

gcacaagctt cttccaccag gtcagctgg

29

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: MT-217 primer

<400> 14

tcgcttctag aggcgcggcc ggcagcatcg tagggc

36

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: MT-218 primer

<400> 15

ggaagaagct tgtgcagcac ccggcc

26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/06807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/80, C12N15/57, C12N1/21, C12N1/20, C12N11/00,
C12P37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/80, C12N15/57, C12N1/21, C12N1/20, C12N11/00,
C12P37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Crowder M.W. et al., Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase L1 from <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , Antimicrob. Agents. Chemother., 1998, Vol.42, No.4, pages 921-6	1-38
A	Hernandez-Justiz O. et al., Evaluation of different enzymes as catalysis for the production of β -lactam antibiotics following a kinetically controlled strategy, Enzyme Microb. Technol., 1999, Vol.25, Nos. 3 to 5, pages 336-43	1-38

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
29 August, 2003 (29.08.03)

Date of mailing of the international search report
09 September, 2003 (09.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N9/80, C12N15/57, C12N1/21, C12N1/20, C12N11/00, C12P37/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N9/80, C12N15/57, C12N1/21, C12N1/20, C12N11/00, C12P37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS(DIALOG) WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Crowder M. W. et al., Overexpression, purification, and characterization of the cloned metallo-beta-lactamase Ll from <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , Antimicrob. Agents. Chemother., 1998, Vol.42, No.4, pages 921-6	1-38
A	Hernandez-Justiz O. et al., Evaluation of different enzymes as catalysis for the production of β -lactam antibiotics following a kinetically controlled strategy, Enzyme Microb. Technol., 1999, Vol.25, No.3-5, pages 336-43	1-38

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.08.03

国際調査報告の発送日

03.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448